10c : La PCR (sensibilité au PTC)

La PCR:

La technique de polymérisation en chaîne (en anglais « polymerase chain reaction ») ou PCR, permet d'amplifier des millions de fois un unique fragment d'ADN. Cette méthode est devenue un outil précieux non seulement pour la recherche en biologie moléculaire mais également pour le diagnostic médical, la détermination de microorganismes ou encore la criminologie. L'invention de la PCR revient à Kary Mullis dans les années 80. Il obtint pour cette découverte le Prix Nobel de Chimie en 1993. La découverte d'ADN polymérases thermorésistantes (la Taq polymérase par exemple) isolées de bactéries (*Thermus aquaticus*) vivant dans des sources d'eau chaude a facilité l'utilisation de la PCR et a permis son automatisation.

Thèmes : la PCR, la structure du génome humain, le génotypage, la criminologie, l'ADN, l'électrophorèse.

Une réaction de PCR nécessite :

1. de l'ADN à amplifier (dénommé template)
2. des amorces (également appelés primers)
3. des desoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
4. une ADN polymérase thermorésistante (la Taq par exemple)
5. du magnésium (Mg++) indispensable au fonctionnement de l'ADN polymérase

Ces 5 ingrédients sont mélangés dans un tube à essai et soumis à différents cycles de températures.

1 cycle de PCR

1ère étape : **la dénaturation** (94°C).
L'ADN template est chauffé à 94°C. Les deux brins de l'ADN se séparent. On parle de dénaturation de l'ADN.

2ème étape : **l'hybridation** (40-65°C).
En descendant la température, les amorces s'apparient (s'hybrident) par complémentarité à leurs séquences cibles sur l'ADN.

3ème étape : **l'élongation** (72°C).
A cette température, la Taq synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates à la suite des amorces. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la vitesse de polymérisation de l'enzyme (la Taq ajoute environ 1000 nucléotides par minute).

Ces trois étapes correspondent à 1 cycle de PCR, à la suite duquel on a doublé le nombre de fragment d'ADN cible initial. Environ une trentaine de cycle sont en principe effectués dans une expérience de PCR classique. Ainsi, après 30 cycles on aura amplifié 2^n fois notre ADN cible.

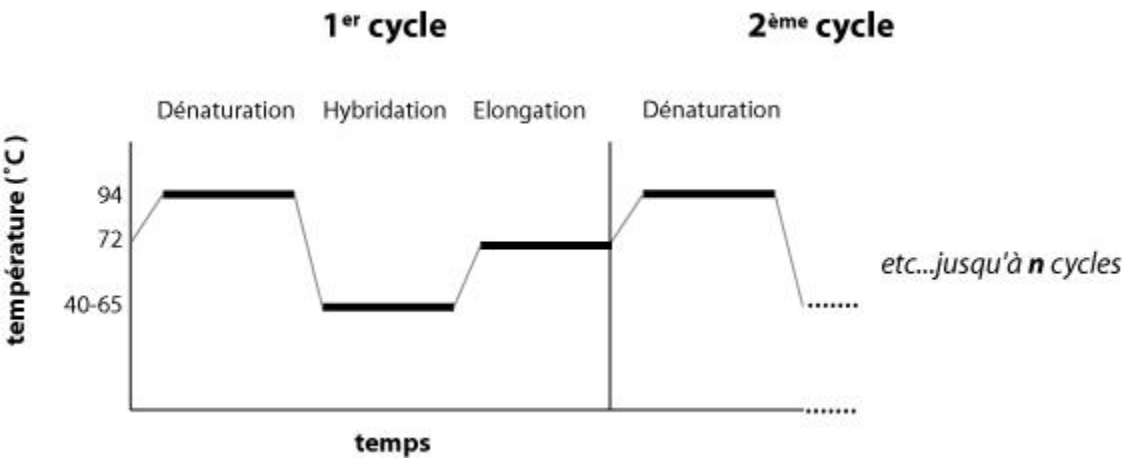
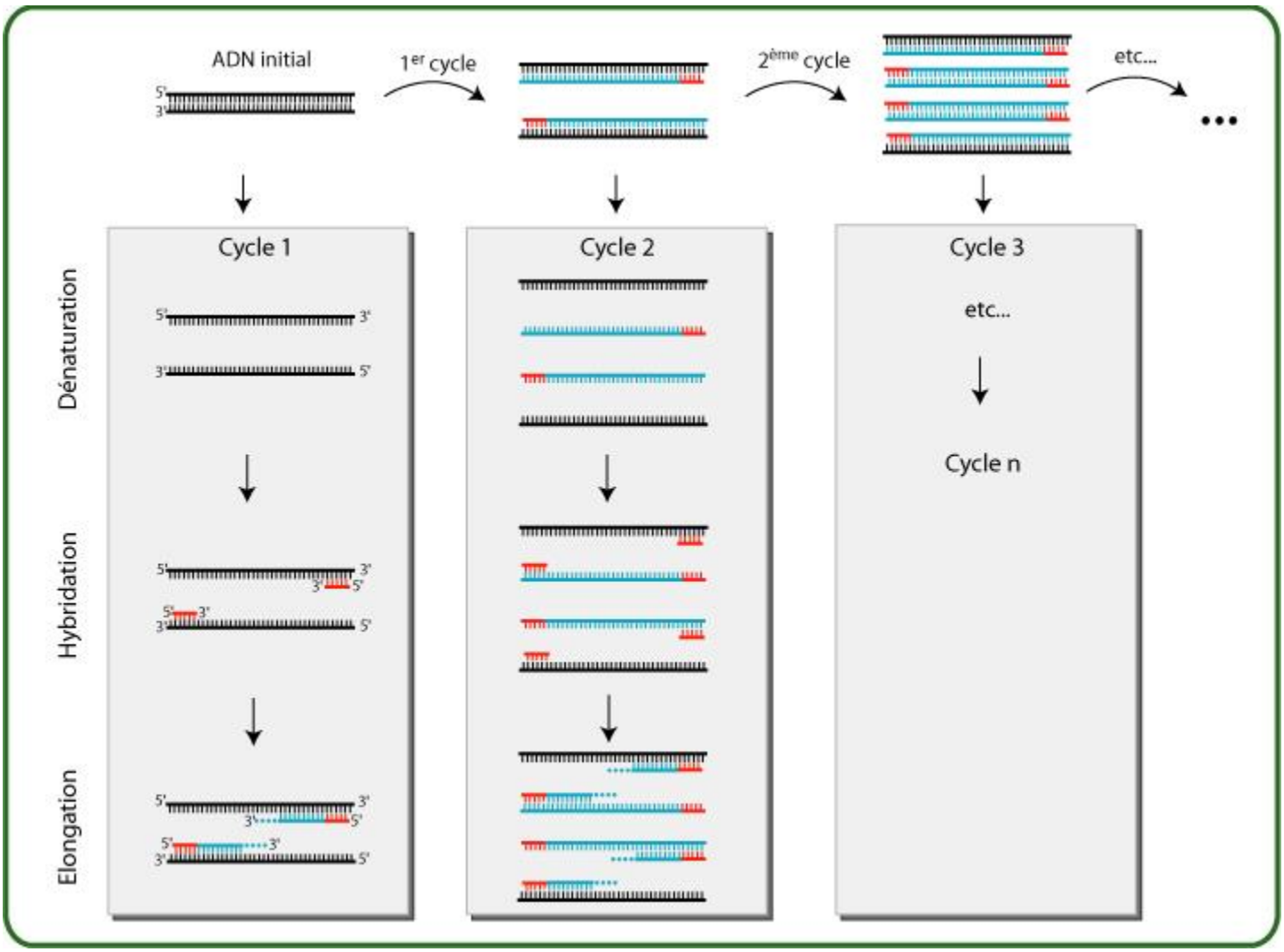


Schéma de l'amplification par PCR:



Protocole PCR sensibilité au PTC :

L'homme est capable de distinguer 5 saveurs fondamentales, le sucré, le salé, l'acide, l'amer et l'umami (glutamate) grâce à des récepteurs situés au niveau de bourgeons gustatifs.
Dans les années 30, un chimiste du nom d'Arthur Fox est le premier à mettre en évidence la différence de sensibilité au PTC (phénylthiocarbamide), un composé organique amer produit par diverses plantes comme le brocoli. Alors qu'il venait de synthétiser ce composé, l'un de ses collègues s'est plaint de l'amertume du produit alors que lui ne sentait rien.
Quelques années plus tard, une étude menée par Albert Blakeslee a montré que l'incapacité à sentir le PTC est un trait génétique récessif qui varie au sein de la population. Les individus sensible peuvent détecter le PTC (allèle T+) et les individus non sensibles ne peuvent pas le détecter (allèle t-).
Il existe une trentaine de récepteurs sensibles aux différentes substances amères. Identifié en 2003, le gène TAS2R38, localisé sur le chromosome 7, code pour le récepteur au PTC. Le séquençage de ce gène a permis de mettre en évidence la présence d'une variation génique entre les individus sensibles et non sensibles. Cette variation se caractérise par une différence de 3 nucléotides, ou SNPs, dans le gène TAS2R38 (en rouge sur la séquence du gène ci-dessous).

SNP
Un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) est une variation dans une séquence d'ADN qui arrive lorsqu'un seul nucléotide diffère entre les membres d'une même espèce. Ces variations sont très fréquentes dans le génome humain, environ 1/1000. Elles représentent d'ailleurs 90% de l'ensemble des variations génétiques humaines.

Gène TAS2R38 (individu non sensible au PTC)

```
  1 atgttgactc taactcgcat ccgcactgtg tcctatgaag tcaggagtac atttctgttc
 61 atttcagtcc tggagtttgc agtggggttt ctgaccaatg ccttcgtttt cttggtgaat
121 ttttgggatg tagtgaagag gcaggcactg agcaacagtg attgtgtgct gctgtgtctc
181 agcatcagcc ggcttttcct gcatggactg ctgttcctga gtgctatcca gcttacccac
241 ttccagaagt tgagtgaacc actgaaccac agctaccaag ccatcatcat gctatggatg
301 attgcaaacc aagccaacct ctggcttgct gcctgcctca gcctgcttta ctgctccaag
361 ctcatccgtt tctctcacac cttcctgatc tgcttggcaa gctgggtctc caggaagatc
421 tcccagatgc tcctgggtat tattctttgc tcctgcatct gcactgtcct ctgtgtttgg
481 tgctttttta gcagacctca cttcacagtc acaactgtgc tattcatgaa taacaataca
541 aggctcaact ggcagaataa agatctcaat ttattttatt cctttctctt ctgctatctg
601 tggtctgtgc ctccttttcct attgtttctg gtttcttctg ggatgctgac tgtctccctg
661 ggaaggcaca tgaggacaat gaaggtctat accagaaact ctcgtgaccc cagcctggag
721 gcccacatta aagccctcaa gtctcttgtc tccttttttct gcttctttgt gatatcatcc
781 tgtgttgcct tcatctctgt gcccctactg attctgtggc gcgacaaaat aggggtgatg
841 gtttgtgttg ggataatggc agcttgtccc tctgggcatg cagccatcct gatctcaggc
901 aatgccaagt tgaggagagc tgtgatgacc attctgctct gggctcagag cagcctgaag
961 gtaagagccg accacaaggc agattcccgg acactgtgct ga
```

Primer forward 5’ CCT TCG TTT TCT TGG TGA ATT TTT GGG ATG TAG TGA AGA GGC GG 3’

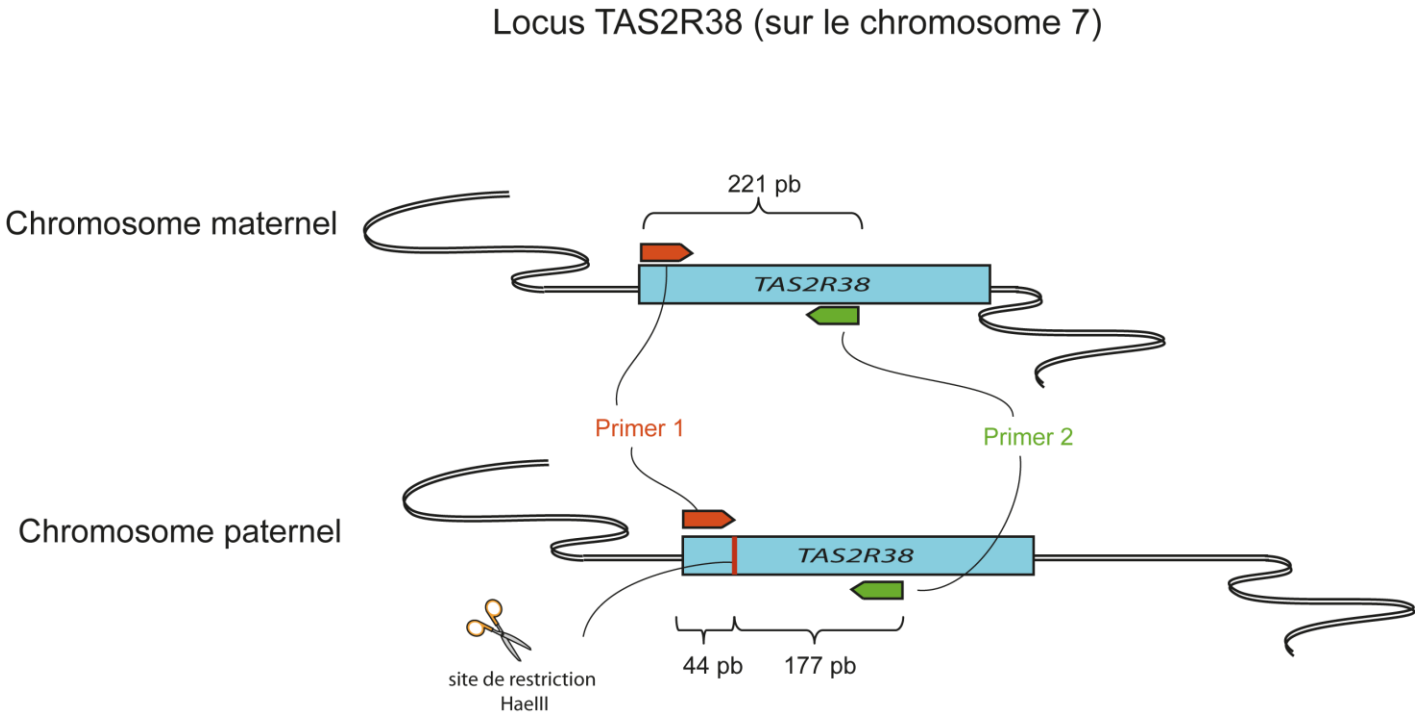
Primer reverse 5’ AGG TTG GCT TGG TTT GCA ATC ATC 3’

Légende :

Les 3 SNPs sont indiqués en rouge :
1er SNP, position 145 : individu sensible C (acide aminé pro), individu non-sensible G (acide aminé ala).
2ème SNP, position 785 : individu sensible C (acide aminé ala), individu non-sensible T (acide aminé val).
3ème SNP, position 886 : individu sensible G (acide aminé val)/, individu non-sensible A (acide aminé ile).

Remarque:

Le primer forward a été conçu de façon à obtenir, à son extrémité, le site de restriction de l’enzyme HaeIII, càd *5’ GGGC 3’* dans le cas d'un individu non sensible au PTC et *5’ GGCC 3’* dans le cas d’un individu sensible.



L'EXPERIENCE:

1) Extraction d'ADN à partir de cellules épithéliales de la bouche

- Mettre 500 µl d'H_2O dans un tube Eppendorf
- Frotter abondamment l'intérieur des joues avec un écouvillon (coton tige) stérile afin d'obtenir un maximum de cellules épithéliales
- Tremper l'écouvillon dans le tube contenant les 500 µl d'H_2O. Tourner l'écouvillon et le frotter contre les parois du tube
- Bien essorer l'écouvillon en le sortant du tube
- Centrifuger le tube 2 minutes à la vitesse maximum afin de faire tomber les cellules épithéliales.
- A l'aide de la P1000 enlever le surnageant en prenant soin de laisser le culot de cellules au fond du tube. Attention à ne pas aspirer le culot de cellules.
- Ajouter 0.1 ml de solution de NaOH 200 mM sur le culot et le resuspendre en vortexant ou en pipetant à l'aide de la P1000
- Fermer le tube et incuber à 95 °C pendant 10 minutes dans le bloc chauffant
- Vortexer brièvement
- Ajouter 0.1 ml de HCl 200 mM dans votre tube.
- Ajouter 0.1 ml Tris-HCl (pH 8.5) 200 mM dans votre tube.
- Votre préparation d'ADN est prête et peut être stockée au congélateur ou utilisée directement pour la suite de l'expérience.

2) Amplification par PCR

- Préparer le mélange de réactif pour la PCR **juste avant l'emploi**. Ce mélange contient le **2 x Taq mix** (taq polymérases, dNTPs, tampon de polymérisation et tampon de charge rouge), les primers et de l'H_2O.
- Pour une classe de 16 élèves par exemple, on compte 16 réactions plus un contrôle négatif ainsi qu'un contrôle positif soit un total de 18 réactions. Afin de faciliter le pipetage et pour avoir assez de matériel en cas d'erreurs nous prévoyons un mélange pour 22 réactions.

	1 réaction	22 réactions
2 x Taq mix (rouge)	12.50 µl	275 µl
Primers mix	5.00 µl	110 µl
DMSO	1.25 µl	27.5 µl
H_2O	1.25 µl	27.5 µl

- Ce mélange est préparé dans un tube Eppendorf 1.5 ml juste avant l'emploi. Mélanger en pipetant en haut et en bas délicatement.
- Distribuer ensuite les 20 µl du mélange dans les petits tubes de PCR préalablement marqué **sur le côté** par les initiales des personnes à tester.
- Dans votre petit tube ajouter 5 µl de votre solution d'ADN. Fermer le tube.
- Dans le petit tube PCR destiné au contôle négatif, ajouter 5 µl d'H_2O à la place de l'ADN. Fermer le tube.
- Dans le petit tube PCR destiné au contôle positif, ajouter 5 µl d'ADN B2B. Fermer le tube.
- **En suivant les instructions** du mode d'emploi de la machine PCR, mettre les tubes dans la machine et lancer le programme PTC.
- Le programme dure environ 1h30. Il comporte les cycles suivants:

94°C, 5 minutes

94°C, 30 secondes
64°C, 45 secondes
72°C, 45 secondes
} 30 cycles

72°C, 5 minutes

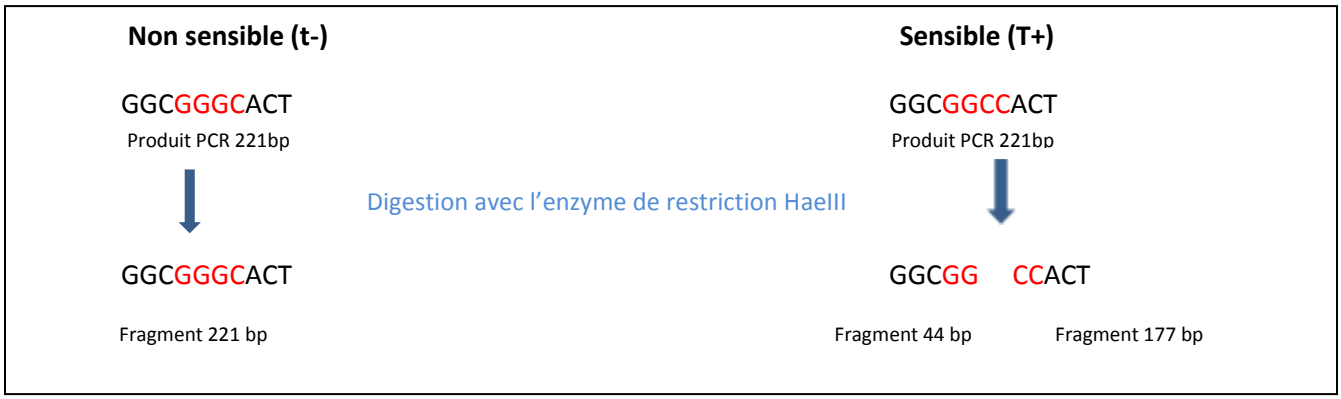
- A la fin de la réaction de PCR les tubes peuvent être gardés au congélateur (-20°C).
- Arrêter la machine PCR en suivant les indications du mode d'emploi.

3) Digestion du produit PCR

- Transférer 13 µl du produit PCR dans un tube eppendorf.
- Garder le reste du produit PCR au congélateur, il pourra être utilisé comme contrôle si nécessaire.
- Ajouter 2 µl du mix de digestion

	1 x	22 x
Tampon digestion 10x	1.5 µl	33 µl
Enzyme HaeIII	0.5 µl	11 µl

- Fermer le tube, le centrifuger quelques secondes afin de tout faire tomber au fond du tube.
- Placer votre tube eppendorf à 37° et laisser digérer 20-30minutes.
- A la fin de la digestion, les tubes peuvent être gardés au congélateur pour la leçon suivante.



4) Préparation du gel d'agarose

Le gel d'agarose est une matrice pour séparer les molécules d'ADN selon leur taille dans un champ électrique. Les petits fragments migrent plus vite que les grands, la concentration d'agarose est choisie en fonction de la taille des fragments à séparer. Ici nous allons utiliser un gel à 2% d'agarose.

- Peser 1.4 g d'agarose et mettez-le dans un Erlenmeyer de 250ml.
- Ajouter 70 ml de tampon d'électrophorèse (TBE 1x).
- Faire bouillir (four à micro-ondes, plaque chauffante ou bec bunsen). Veillez à ce que l'agarose ne déborde pas en bouillant. L'agarose fondu est complètement transparent. Si certains résidus sont toujours visibles, remettre la solution à chauffer.
- Laisser refroidir le liquide (à environ 60°C).
- Ajouter 7 µl de SYBR-safe (intercalant qui permettra de visualiser l'ADN) et mélanger en agitant l'Erlenmeyer.
- Verser l'agarose dans la cuve préparée avec un peigne pour former les puits (attention si l'agarose est trop chaud la cuve d'électrophorèse se déforme !)

Après solidification du gel, découper une petite lamelle d'agarose en haut et en bas du gel pour libérer les électrodes.

- Lorsque le gel est refroidi et solidifié ajouter du tampon d'électrophorèse (TBE 1x) et enlever le peigne.

5) Analyse des génotypes sur gel

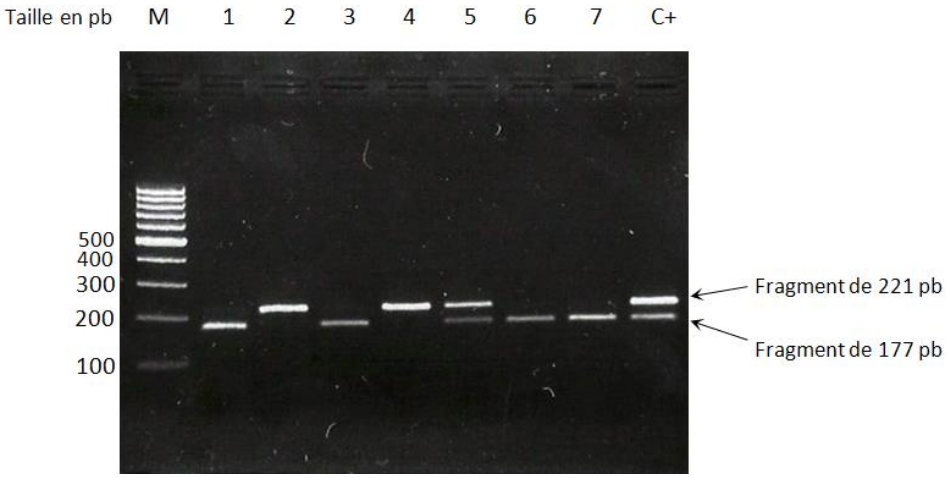
- Récupérer vos tubes. Ils contiennent déjà le tampon de charge (rouge) et sont donc prêts à être mis sur gel.
- Charger le gel:

1er puits: 5 µl de marqueur.
2ème puits et suivants: 10 µl de vos échantillons digérés.
Avant dernier puits: le contrôle négatif.
Dernier puits: le contrôle positif.

- Allumer le transformateur et faire migrer à 100V (ampérage maximum).
- Quand le colorant rouge de migration arrive en bas du gel, arrêter le transformateur.
- Laisser refroidir le gel quelques instants. Eventuellement en le mettant au frigo. L'intensité du signal sera ainsi plus forte.
- Prendre le gel et visualiser les bandes sous la lampe bleue.
- Prendre une photo.

6) Résultats et discussions

Voici un exemple de résultat :



M : marqueur de taille. Colonnes 1 à 7 : génotypes de 7 individus. Les individus 1, 3, 6, 7 sont sensibles au PTC (+/+), les individus 2 et 4 sont non-sensibles au PTC (-/-), l'individu 5 et le contrôle positif sont sensibles (+/-).

Homozygote non sensible au PTC (-/-) : 1 fragment de 221 bp (individus 2 et 4)

Homozygote sensible au PTC (+/+): 2 fragments de 177 et 44 bp (individus 1, 3, 6, 7)

Remarque: la bande à 44 bp n'est pas visible

Hétérozygote (+/-) sensible au PTC: 3 fragments de 221, 177 et 44 bp (individu 5 et contrôle positif)

Analyse du génotype :

- Observez votre génotype et ceux des autres personnes
- Calculez la fréquence des génotypes de la classe
- Calculez la fréquence des allèles de la classe
- Calculez la valeur de Hardy-Weinberg pour la classe

Analyse du phénotype :

La sensibilité au PTC est un trait génétique dominant. Ainsi les personnes homozygote (+/+) et hétérozygote (+/-) devraient détecter l'amertume du produit. Pour le vérifier, vous allez recevoir deux papiers, l'un imprégné de PTC et l'autre pas.

Commencez par déposer sur votre langue le papier contrôle, non imprégné et testez ensuite le papier imprégné de PTC.

Que constatez-vous ?

Vérifiez s'il y a concordance entre le génotype et le phénotype.

Matériel:

- P20
- P200
- P1000
- Pointes jaunes stériles
- Pointes bleues stériles
- Ecouvillons stériles
- Solutions NaOH, HCl et Tris-HCl
- Tubes eppendorf 1.5 ml
- Machine PCR + tubes PCR
- Cuves électrophorèse + transformateur
- Bloc chauffant
- Centrifugeuse
- Agarose
- TBE 1x
- SYBR Safe
- Bouteilles d'eau stérile
- RedTaq Ready mix
- PTC primers mix
- DMSO
- ADN contrôle
- Tampon de digestion
- Enzyme HaeIII
- Marqueur d'ADN